

迅速HE染色を用いた術中捺印細胞診の乳癌センチネルリンパ節転移診断における有用性

保谷 俊行¹⁾, 高橋 秀史¹⁾, 前島 澄子¹⁾, 吉田 佳子¹⁾, 高橋 郷子¹⁾,
松岡 伸一²⁾, 中島 信久²⁾, 前田 好章²⁾, 秦 温信²⁾

札幌社会保険総合病院 1)検査部

2)外科

最近、乳癌においてセンチネルリンパ節 (sentinel lymph node) への転移の有無が、腋窩リンパ節転移状況を反映する可能性が示唆され、センチネルリンパ節転移陰性の乳癌症例に対して腋窩リンパ節郭清を省略できることが明かとなってきた。今回われわれは、術中迅速組織診で行っている迅速 hematoxylin-eosin (HE) 染色を捺印細胞診へ応用し、センチネルリンパ節転移診断における有用性について検討した。迅速 HE 染色による捺印細胞診を HE 染色による永久標本組織診と比較したところ感度は50%、特異度95.8%であり、判定一致率86.6%であった。今回の検討により、細胞診標本から微小転移と考えられる癌細胞の検出も可能と考えられた。迅速 HE 染色を用いた術中捺印細胞診は、短時間で染色可能であり、迅速組織診と併用することにより診断精度の向上に役立ち、センチネルリンパ節の転移診断法として有用と考えられた。

キーワード：センチネルリンパ節、術中細胞診、迅速 HE 染色、乳癌

はじめに

乳癌におけるセンチネルリンパ節 (sentinel lymph node) とは、乳腺のリンパ流が最初に到達する第一腋窩リンパ節である。最近その転移の有無が、腋窩リンパ節転移状況を反映する可能性が示唆されており、センチネルリンパ節転移陰性の乳癌症例に対して腋窩リンパ節郭清を省略できることが明かとなってきた¹⁾。

当院では、正診率の向上を目的としてリンパ節の転移診断をはじめとする多くの術中迅速診断に迅速組織診とともに、捺印細胞診も併用して検討している。われわれは、術中迅速組織診で行っている迅速 hematoxylin-eosin (HE) 染色を甲状腺捺印細胞診で実施し、その有用性を確認した²⁾。今回迅速 HE 染色を用いた術中捺印細胞診の乳癌センチネルリンパ節転移診断における有用性について、免疫細胞化学染色も施行し検討したので報告する。

対象および方法

対象は2000年7月から2004年4月までに当院外科において手術を施行した乳癌症例のうち色素 (1%

イソスルファンブルー) を用いてセンチネルリンパ節が同定され、術中迅速組織診と術中捺印細胞診を実施した23症例 (40~88歳:平均60.3歳) で、センチネルリンパ節30個である。

具体的な方法としては、手術の際に色素を乳輪周囲の皮下4カ所に注入 (注入総量は体重1kgあたり1/20ml) し、5分間マッサージを行い、腋窩に皮切を加えて青染したリンパ節をセンチネルリンパ節と同定し摘出する。センチネルリンパ節を約2mm間隔で細切後、剖面より捺印細胞塗抹標本を作製し直ちに95%エタノールで固定し迅速 HE 染色を行い判定した。

対照として、通常細胞診で行っているPapanicolaou (以下 Pap) 染色を実施し、染色性について検討した。判定結果の評価と確認のために、Pap 染色標本を脱色後マイクロウェーブによる抗原賦活化を行い、上皮由来の転移性悪性腫瘍の同定に有用とされている抗サイトケラチン モノクローナル抗体 (AE1, AE3; ニチレイ) を用いて免疫細胞化学染色 (HPR 標識アミノ酸ポリマー試薬・シンプルスステイン PO; ニチレイ) を実施した。免疫細胞化

学染色では細胞質が明瞭に染色されたものを陽性とし、細胞集団および単個細胞のみ染色された場合も転移陽性と判定した。

迅速組織診は細切後のすべての組織片から2枚以上の凍結切片を作製し、迅速 HE 染色を行い判定した。残った組織はホルマリン固定後パラフィン包埋して、HE 染色による永久組織標本を作製し、それぞれの成績を比較した。また、細胞診同様に抗サイトケラチンモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。当院で行っている迅速 HE 染色の方法を表1に示す。染色液は迅速組織診用のものと共用しており、鏡検まで約2分間を要する。

表1. 迅速 HE 捺印細胞診染色法

固 定； 95%エタノール	30秒以上
核染色； ギルヘマトキシリン	40秒
分 別； 0.5%塩酸・70%エタノール溶液	2回
色だし； 0.05%炭酸リチウム水溶液	4回
エオジン；	2回
脱水・透徹・封入	

結 果

すべての症例についての結果を表2に示す。

各症例の提出センチネルリンパ節数は1～2個であり、2個検出された7症例のうち症例2，症例19をのぞき、2個のリンパ節の判定結果は一致した。同定されたセンチネルリンパ節30個のうち迅速捺印細胞診による転移陽性は4個で、そのうち永久標本組織診で転移陽性と確認されたものは3個であった。迅速捺印細胞診による転移陰性は26個で、そのうち HE 染色による永久標本組織診でも癌病巣を認めないものが23個で、偽陰性としたものが3個あった(表3)。したがって迅速 HE 染色による捺印細胞診を HE 染色による永久標本組織診と比較した捺印細胞診の感度は50% (3 / 6)、特異度95.8% (23 / 24) であり、一致率は86.6% (26 / 30) であった。また、すべての迅速 HE 染色標本において Pap 染色標本の判定結果と一致した。

捺印細胞診では、異型の強い癌細胞や重積性の配列をした上皮性結合を示す細胞集団として出現する

表2. 乳癌センチネルリンパ節細胞診実施症例

症例 番号	年齢	細胞診		術中組織診	永久組織標本		他のリンパ節 への転移	組織型
		迅速HE	免疫細胞化学	迅速HE	HE	免疫組織化学		
1	40	—	—	—	—	—	—	非浸潤癌
2	59	—	+	+	+	+	+	硬癌
3	48	—	—	—	—	—	—	乳頭腺管癌
4	88	—	—	—	—	—	—	乳頭腺管癌
5	88	+	+	+	+	+	+	硬癌
6	74	+	+	—	残なし	残なし	—	硬癌
7	53	—	—	—	—	残なし	—	乳頭腺管癌
8	45	—	+	—	—	+	+	硬癌
9	77	—	—	—	—	—	—	硬癌
10	60	—	—	—	—	—	—	硬癌
11	47	—	—	—	—	—	—	乳頭腺管癌
12	70	—	—	—	—	—	—	硬癌
13	39	+	+	+	+	+	+	硬癌
14	59	—	—	+	+	+	+	硬癌
15	55	—	—	—	—	—	—	乳頭腺管癌
16	43	—	—	—	—	—	—	充実腺管癌
17	79	—	—	—	—	—	+	乳頭腺管癌
18	80	—	—	—	—	—	—	粘液癌
19	44	—	—	—	+	+	+	硬癌
20	71	—	—	—	—	—	—	充実腺管癌
21	50	—	—	—	—	—	—	充実腺管癌
22	75	—	—	—	—	—	—	乳頭腺管癌
23	42	—	—	—	—	—	—	乳頭腺管癌

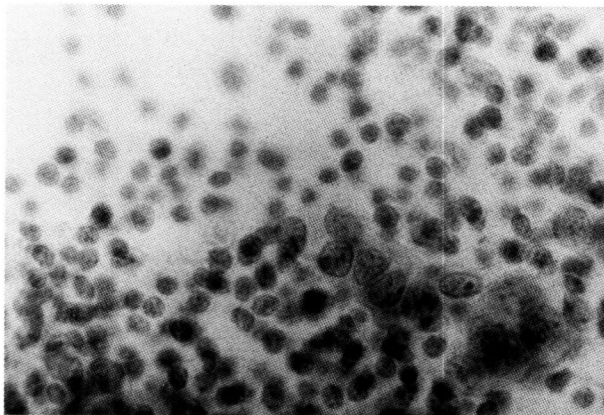
+: 陽性、-: 陰性、残なし: リンパ節の構造がない、

表3. センチネルリンパ節の捺印細胞診と永久標本組織診の比較
(リンパ節単位)

迅速細胞診	永久標本組織診 (HE 染色)	
	陽性	陰性
陽性 4	3	1
陰性 26	3	23

感度50% (3/3)、特異度95.8% (23/24)、判定一致率86.6% (26/30)

場合の判定は容易であるが、小型な核と広い細胞質を有する単個細胞の場合はマクロファージなどと鑑別を要することがある。通常細胞診において実施しているPap染色と比較すると、迅速HE染色ではクロチマンが微細で、核縁の不均等肥厚も乏しく、より良悪の判定が難しいことがある。また細胞質の辺縁が不明瞭で上皮性結合がわかりづらいことがあるものの、その染色に慣れることで診断は十分可能であった(図1)。

図1. センチネルリンパ節捺印細胞像：
リンパ球背景に上皮性結合を示す
癌細胞集塊を認める(迅速HE染色、対物×40)

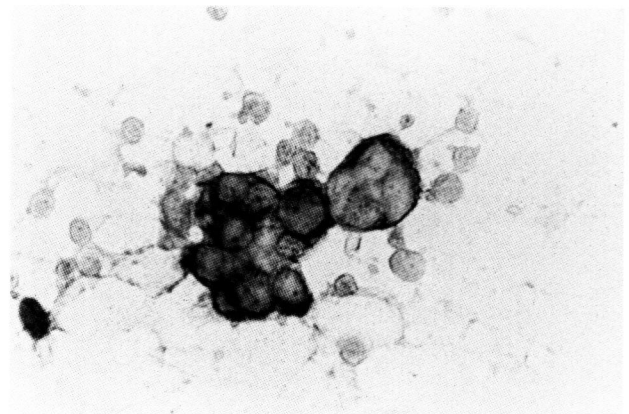
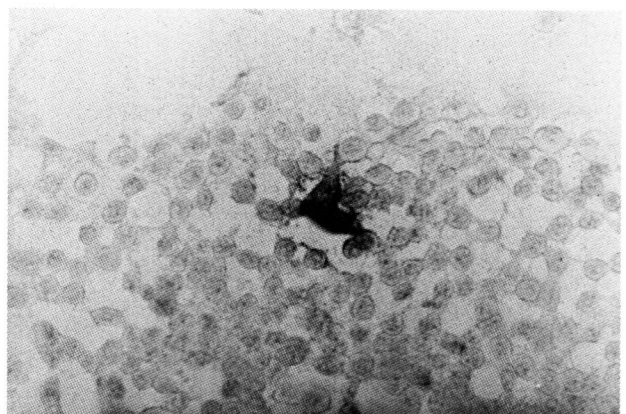
考 察

捺印細胞診の迅速HE染色の結果から転移陽性と考えた1個(症例6)は、Pap染色標本を脱色後に免疫細胞化学染色(図2)を実施したところ、上皮性結合を示す異型細胞集塊の細胞質に陽性所見を認めたことから真の転移陽性と考えられた。しかし、永久組織標本では組織の消耗によってリンパ節の成分が残存しなかったため、今回の検討においては偽陽性と判定せざるをえなかった。

症例14および症例19では術中迅速細胞診で転移陰性、永久組織標本では転移陽性と判定し、結果的に細胞診で偽陰性とした。しかし、永久組織標本での転移径はともに1mm未満であり、TNM分類

(UICC第6版)³⁾で転移径0.2mm以上2mm以下の微小転移に相当するpN1mi: Micrometastasisと考えられ、Pap染色標本脱色後の免疫細胞化学染色の結果が陰性であったことから細胞塗抹面には腫瘍細胞が露出していなかったと考えられた。

症例2では2個のセンチネルリンパ節提出がありそのうち1個は迅速細胞診による判定は転移陰性で偽陰性とした。Pap染色標本脱色後に免疫細胞化学染色を実施したところ、単個細胞であったが細胞質が明瞭に染色され、陽性が確認された(図3)。しかし迅速HE染色標本を用いた免疫細胞化学染色では陰性であった。この症例については、腫瘍細胞量が少なかったために標本作製の際にすべての標本に腫瘍が塗抹されなかった、もしくは固定および染色の過程で細胞剥離がおきた可能性がある。Pap染色標本でも診断が困難な症例であったが、迅速HE染色標本における判定は正しかったと考えられた。

図2. センチネルリンパ節捺印細胞像：
癌細胞集塊に陽性所見を認める
(症例6、抗サイトケラチン抗体免疫細胞化学染色、対物×40)図3. センチネルリンパ節捺印細胞像：
単個細胞に陽性所見を認める
(症例2、抗サイトケラチン抗体免疫細胞化学染色、対物×40)

症例8では術中迅速診断では細胞診、組織診ともに陰性と判定したが、免疫細胞化学染色(図4)および免疫組織化学染色により単個細胞のみであったが細胞質が染色された。本症例は、TNM分類で転移径0.2mm以下の isolated tumor cells:ITC に相当し、永久組織標本にて他の腋窩リンパ節に転移が確認されていることから、センチネルリンパ節も転移陽性と推測された。術中細胞診においても、免疫細胞化学染色をくわえることより細胞診標本から微小転移と考えられる癌細胞の検出が可能と考えられた。

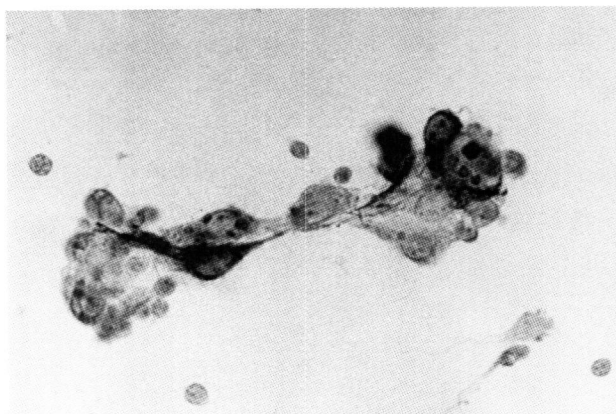


図4. センチネルリンパ節捺印細胞像:
数個の細胞に陽性所見を認める
(症例8、抗サイトケラチン抗体免疫細胞化学染色、対物×40)

センチネルリンパ節の術中転移診断の方法には迅速組織診と迅速細胞診とがある。迅速組織診はリンパ節内の転移巣を直接観察できるが、凍結によるアーチファクトの影響が大きい、症例6のごとく永久標本にまわすべきリンパ節組織を消耗する、組織片が多くなると検査時間と労力がかかる、などの短所がある。一方、迅速細胞診は、検査時間が短い、リンパ節の消耗がほとんどない、微小転移を検出するなどの長所があるが、単個で出現する癌細胞の判定が難しい、迅速染色による細胞判定には熟練を要するなどの短所がある。

術中捺印細胞診によるセンチネルリンパ節の転移診断では、諸家の報告があるが、南雲ら⁴⁾は乳癌81例の125個のセンチネルリンパ節に対してPap染色と免疫細胞化学染色を全例に行い感度94.3%、特異度96.7%と良好な成績を報告している。

われわれの検討では、術中に免疫細胞化学染色を実施しておらず、これを加えることにより成績は向上するものと考えられる。今回の細胞診および組織診に

よる判定のうちいずれかの方法で陽性としたものをセンチネルリンパ節転移陽性とする、免疫細胞化学染色を加えた細胞診での正診率は93.3% (28/30)と迅速組織診の90.0% (27/30)を上回る。また、南雲ら⁴⁾は迅速組織診には細切した組織片の1枚のみを提出し、残りの組織片はすべて永久標本作製に使用しているが、われわれの検討では細切後のすべての組織片から2枚以上の凍結切片を作製している。このことにより今回迅速組織診の成績が向上し、迅速細胞診の結果を上回ったものと考えられた。

捺印細胞診では、迅速組織診に比較して塗抹面を増やしても標本作製に要する時間は短く、細胞の保持および染色性に優れた固定液の検討や、免疫染色を術中に迅速実施するなど技術面での改良を加えることにより、さらなる検査精度の向上が期待できる。迅速HE染色を用いた術中捺印細胞診は、短時間で染色可能であり、迅速組織診と併用することにより診断精度の向上に役立ち、センチネルリンパ節の転移診断法として有用と考えられた。

まとめ

1. 乳癌の23症例、センチネルリンパ節30個について捺印細胞診の成績を病理組織診断の結果と比較し良好な結果を得た。
2. 抗サイトケラチンモノクローナル抗体を用いた免疫細胞化学染色により、微小転移を検出できると考えられた。
3. 迅速HE染色を用いた術中捺印細胞診の併用は、センチネルリンパ節の転移診断法として有用で正診率の向上に寄与すると考えられた。

なお、本研究は平成14年度および15年度札幌社会保険総合病院研究助成金の援助を受けた。

文 献

- 1) 元村和由、菰池佳史、稲治英生、他：乳癌における sentinel lymph node biopsy. 日本外科系連合学会誌 26: 159-162、2001
- 2) 前島澄子、保谷俊行、佐藤正幸、他：迅速hematoxylin-eosin染色による甲状腺捺印細胞診の検討. 日臨細胞北海道会報 11: 5-8、2002

- 3) 日本乳癌学会編：乳癌取り扱い規約、第15版、
金原出版、東京、2004
4) 南雲サチ子、元村和由、宝来 威、他：乳癌に
おける sentinel lymph node の術中転移診断
法としての捺印細胞診の有用性.乳癌の臨床 1
6：137-141、2001

The feasibility of intraoperative imprint cytology stained with hematoxylin-eosin in sentinel lymph node biopsy for the mastectomy

Toshiyuki YASUTANI¹⁾, Shuji TAKAHASHI¹⁾, Sumiko MAEJIMA¹⁾,
Yoshiko YOSHIDA¹⁾, Satoko TAKAHASHI¹⁾, Shinichi MATSUOKA²⁾,
Nobuhisa NAKAJIMA²⁾, Yoshiaki MAEDA²⁾, Yoshinobu HATA²⁾

1)Department of Clinical Laboratory, Sapporo Social Insurance General Hospital

2)Department Surgery, Sapporo Social Insurance General Hospital

There are reports showing the clinical significance of sentinel lymph node biopsy (SNLB) for the breast cancer especially in the decision-making of axillary lymph node dissection. In this report, we tried to examine the feasibility of intraoperative imprint cytology stained with hematoxylin-eosin comparing with the conventional frozen-section pathological examination. In the analysis of twenty-three cases of mastectomy, the imprint cytology showed 50% sensitivity, 95.8% specificity and 86.6% coincident-rate in comparison to the frozen-section pathology. The imprint cytology seemed to be able to detect the micrometastatic cancer cells. The present study demonstrated that the imprint cytology is feasible in the mastectomy and may improve the accuracy of SNLB.